

ラベンダーの組織培養と有用成分の分析

生物資源科学部 生物生産科学科

1 年 村上 萌

1 年 阿部 百香

1 年 安部 結美

1 年 真崎 舞雪

指導教員 生物資源科学部 生物生産科学科

助教 川上 寛子

【背景および目的】

ラベンダーは、シソ科ラヴァンドラ属の半木本性植物の通称で、半耐寒性の低木 *Lavandula angustifolia* を指す。ラベンダーにはリナロールや酢酸リナリルなどの成分が含まれており、リナロールは鎮静やリラックス作用、酢酸リナリルは安眠効果や抗炎症を示すことが明らかになっている。アロマやハーブティー、化粧品など様々な用途で使用されている。

このようにラベンダーは有用であり栽培が主な生産方法であるが、野外では天候や害虫の影響を受けて生産が不安定になることがある。そこで、安定した大量生産方法を確認する必要があり、私たちは組織培養技術に着目した。本研究はラベンダーの組織培養物から抗酸化活性成分を見出すことを目的とした。

【材料及び方法】

□ 培地作製

- ① ビーカーに蒸留水を 800 mL 入れ、スターラーで攪拌し、ムラシゲスクーグ (MS) 基本培地を 4.4 g もしくはガンボーグ B5 基本培地を 3.2 g、sucrose 30 g、Plant Preservative Mixture (PPM™) を 0.5 mL を測り入れ、溶解させた。
- ② 蒸留水 200 mL を加えて 1000 mL にメスアップした。
- ③ 植物ホルモン 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} M BA、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} M NAA をマイクロピペットで 1 mL を量り取り、ビーカーに表 1 の組み合わせに従って入れ、②の液を 100 mL ずつ加え希釈した。これを攪拌し、pH を 5.7 ～ 5.8 の間に調整した。
- ④ 寒天を 1 g 測り、100 mL 三角フラスコに入れ、これを 9 つ用意した。
- ⑤ ④の三角フラスコに 100 mL ずつ培地を移し替え、スターラーで攪拌した。

表 1 植物ホルモンの種類及び濃度

植物ホルモンの 種類及び濃度		BA (M)		
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
NAA (M)	10^{-5}	N5B5	N6B5	N7B5
	10^{-6}	N5B6	N6B6	N7B6
	10^{-7}	N5B7	N6B7	N7B7

- ⑥ ⑤の三角フラスコに 3 重のアルミホイルで蓋をした後、121 °C で 5 分間オートクレーブした。
- ⑦ 試験管に 10 mL ずつ分注した。
- ⑧ ⑦を 121 °C で 20 分間オートクレーブした。
- ⑨ 実験台にシャーレを置き、試験管立てを傾けて置くことで斜面培地にした。一晩ほど静置して培地

を固めた。

□ 組織培養

- ① 赤玉土、黒土、培養土、鹿沼土、腐葉土を 4:4:4:4:1 の割合で混合した土で栽培していたラベンダー苗から葉 40 枚を採取した。
- ② 70 % エタノールに 1 分、10 % 次亜塩素酸に 15 分、ラベンダーの葉を浸漬し、その後 3 度滅菌水で洗浄した。
- ③ 葉を葉脈に対して垂直に 5 mm にして切り、培地に植え付けた。
- ④ 培養室内で 20 度、明条件下で培養した。

□ 薄層クロマトグラフィーによる成分分析

N5B5、N6B5、N6B7、N7B6のカルスを用いてメタノールとアセトンでそれぞれ成分抽出を行った。

展開液の組成は以下の3種類、クロロホルム：メタノール=9：1、クロロホルム：メタノール=4：1、クロロホルム：メタノール=1：1を用いた。抗酸化成分を検出するために、展開後のTLCシートに0.2 % 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 溶液を噴霧した。

- ① 縦10 cmのTLC (Slica gel 60RP-18 F254 s, 1.05559.0001, メルク・ジャパン株式会社) の薄層表面上から5 mm、下から15 mmのところの線を引き、エキスをスポットした。
- ② 展開槽に溶媒を5 mmの高さまで入れ、展開槽に溶媒蒸気が充満するまで待った。
- ③ サンプルをスポットしたTLCシートを展開槽に入れ、TLC上部の線まで展開させた。
- ④ TLCシートを取り出し、乾燥させた後UVランプでサンプルのスポットを確認した。
- ⑤ 抗酸化成分を検出するために 0.2 % DPPHを噴霧した。さらに抽出物に含まれる多くの成分を検出するために10 %硫酸を噴霧後100度で加熱した。

【結果】

□ 組織培養

植物ホルモンの濃度の組み合わせがBAとNAAが同じ濃度のものはカルス誘導率が低かった。10⁻⁷ M NAAと10⁻⁵ M BA の組み合わせでは不定根が見られた。10⁻⁷ M NAAと10⁻⁶ M BAの組み合わせでは特に高いカルス誘導率を示した。

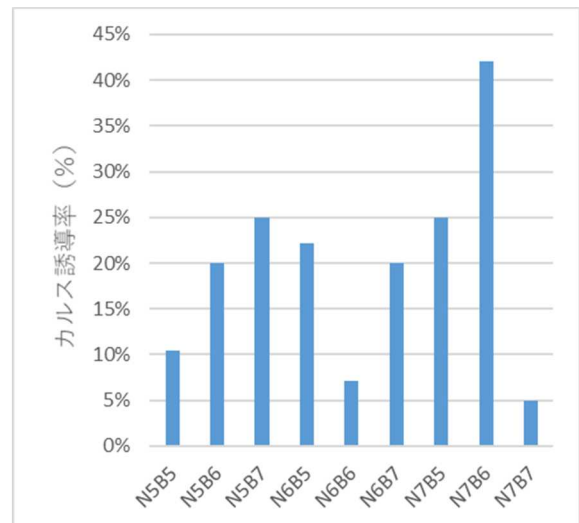


図 1 培養 17 週目の葉のカルス誘導率

□ 薄層クロマトグラフィーによる成分分析

培養物由来の抽出物を TLC によって成分分析した結果を図 2、3 に示す。展開溶媒にクロロホルム：メタノール=4:1 もしくは 9:1 を用いた際に、硫酸噴霧と加熱で検出したところ、原点にスポットが濃く残っていた。また DPPH を噴霧した検出結果から、抗酸化活性成分が原点に多く含まれていることがわかった。展開溶媒にクロロホルム：メタノール=1:1 を用いた条件では抗酸化成分が分離さ

れた。メタノールで抽出した成分では N5B5 が Rf=0.3、N6B5 が Rf=0.3、N6B7 が Rf=0.5 に、アセトンで抽出した成分では N5B5、N6B5、N6B7、N7B6 がともに Rf=0.4 の地点にスポットが検出された。

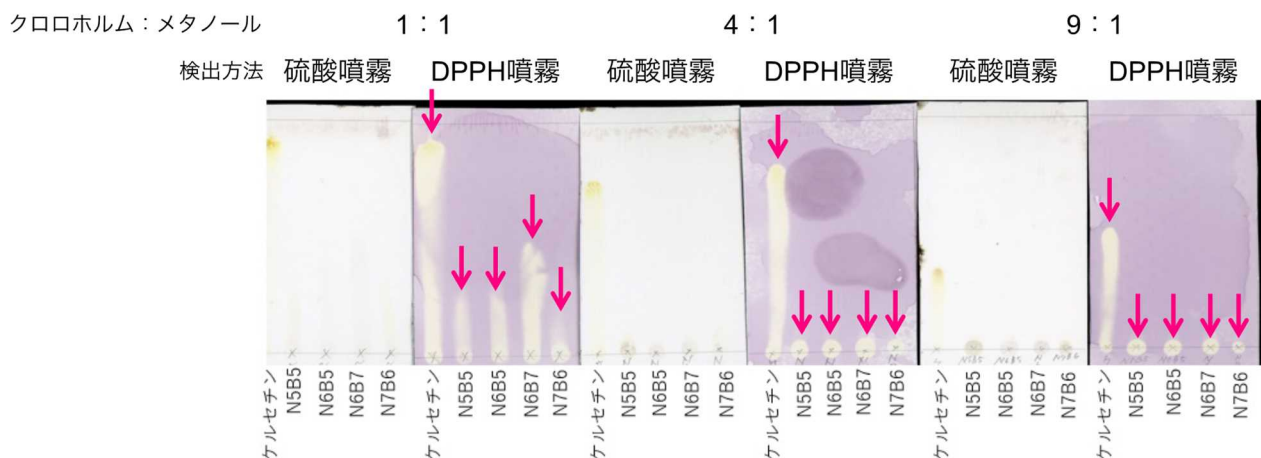


図 2 メタノールによる抽出成分の TLC 分析結果

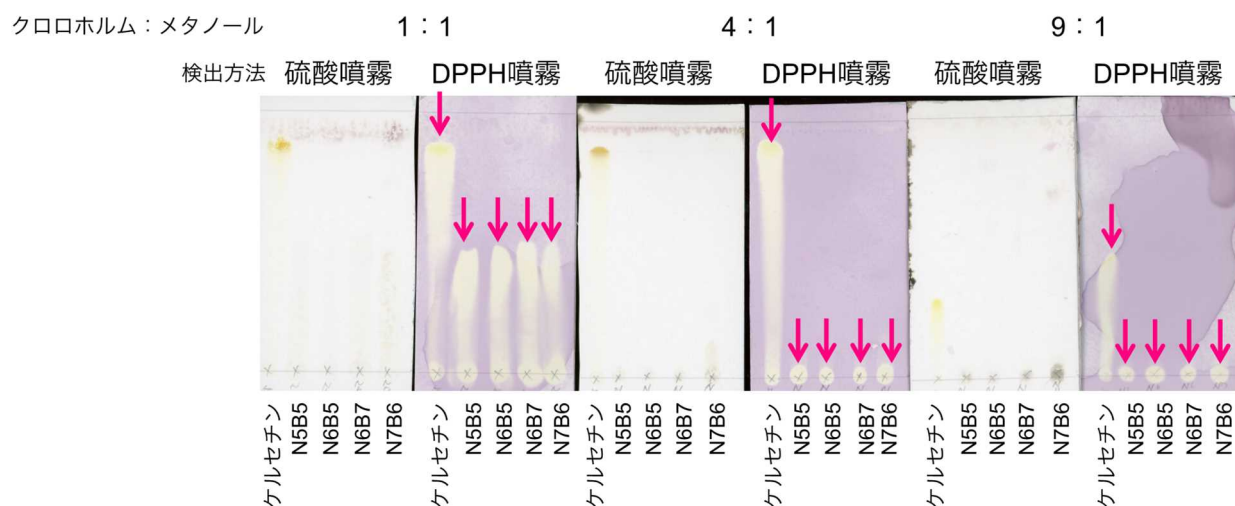


図 3 アセトンによる抽出成分の TLC 分析結果

【考察】

ラベンダーの葉を組織培養した場合、植物ホルモン NAA と BA の濃度は同じではなく変える必要があることが分かった。BA の濃度よりも NAA が低濃度の場合、高い誘導率が得られた。TLC 分析の結果から、どの展開溶媒を用いた場合にも原点に強い抗酸化活性成分が見られた。原点に存在することから活性成分は極性が高い水溶液成分であると考えられた。今後、リナロールや酢酸リナリルなどのラベンダー天然植物体に含まれている成分と分析結果を比較することで、活性成分の特定につながると考えられる。

【参考文献】

池田和博(2016) 『アロマセラピーのための精油ハンドブック』丸善出版